



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS BAIXADA SANTISTA**

CAROLINA DE SOUZA GOULART

HISTAMINA HIPOCAMPAL, APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

SANTOS, 2010

CAROLINA DE SOUZA GOULART

HISTAMINA HIPOCAMPAL, APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de São
Paulo- Campus Baixada Santista, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Fisioterapia.

Orientadora: Profa . Dra. Carla Christina Medalha

CEP: 1616/09.

SANTOS, 2010

Goulart, Carolina de Souza

Histamina Hipocampal, Aprendizagem e Memória / Carolina de
Souza Goulart - - Santos, 2010
26p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal de São Paulo – UNIFESP – Campus Baixada Santista, 2010

Curso: Fisioterapia

Orientador: Carla Christina Medalha

1. Histamina. 2. Aprendizagem. 3. Memória. 4. Hipocampo. 5.
Neuroplasticidade I. Carla Christina Medalha II. Histamina Hipocampal,
Aprendizagem e Memória. III. Santos - Campus Baixada Santista.

CDD 615.82

GOULART, Carolina de Souza

HISTAMINA HIPOCAMPAL, APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal de São Paulo- Campus Baixada Santista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Carla Christina Medalha

INSTITUIÇÃO: UNIFESP

JULGAMENTO: _____

ASSINATURA: _____

Prof^a. Dr^a. Cristina dos Santos Cardoso de Sá

INSTITUIÇÃO: UNIFESP

JULGAMENTO: _____

ASSINATURA: _____

Prof^a. Dr^a. Luciana Le Sueur Maluf

INSTITUIÇÃO: UNIFESP

JULGAMENTO: _____

ASSINATURA: _____

Prof^a. Dr^a. Erika Mattos Santangelo

INSTITUIÇÃO: UNIFESP

JULGAMENTO: _____

ASSINATURA: _____

*Dedico aos meus pais, Maria Ester e
José Braz, por estarem sempre do meu
lado*

Agradecimentos

A Deus por estar constantemente ao meu lado, me iluminando em todos os momentos, principalmente os mais difíceis.

Aos meus pais e minha querida irmã que sempre me incentivaram a buscar meus sonhos. Sem eles não teria conseguido chegar até aqui!

A professora Carla Christina Medalha, um exemplo de orientadora e amiga, fundamental para a escolha do meu futuro profissional.

Aos meus colegas de trabalho: Beatriz, Giuliana, Bárbara e José, essenciais para a realização da pesquisa, tornando ainda mais agradável os momentos de trabalho.

Aos meus amigos de faculdade, em especial Beatriz, Giuliana e Tayla, que pela amizade fizeram mais fácil esse período longe de casa.

Às meninas do meu grupo de estágio, pela amizade construída, paciência e pelos momentos de alegria proporcionados ao longo desse ano difícil.

Aos professores da UNIFESP que guardarei sempre com muito carinho em meu coração.

RESUMO

A neuroplasticidade é a capacidade do SNC de alterar a sua estrutura com base nas experiências, responsável pelo mecanismo de aprendizagem. Estudos sugerem que drogas e neurotransmissores que participam dos processos de memória e aprendizagem são de fundamental importância para o entendimento do processo de recuperação após lesão de SNC. O presente estudo visa analisar as ações do sistema histaminérgico hipocampal sobre os processos de aquisição e consolidação da memória, em um teste de esquila. Ratos Wistar machos foram implantados com cânulas nas regiões ventral e dorsal do hipocampo e treinados em um paradigma de esquila inibitória. O animal foi individualmente colocado na plataforma, e no momento em que colocava as quatro patas no assoalho metálico, um choque foi liberado nas patas por 2s (0,4 mA; 40V). O procedimento era repetido até o rato permanecer 50s na plataforma. A latência de descida foi registrada e imediatamente após o treino os grupos de animais receberam o tratamento com histamina, salina (controle), coinfusão de histamina e antagonistas receptores H_1 (Pirilamina; 10,0 nmol/região) e H_2 (Ranitidina; 20,0 nmol/região) no hipocampo dorsal ou ventral. Após 24 horas foi feito o teste no qual a evocação da memória foi testada por meio da repetição do procedimento de esquila. A retenção da memória foi verificada através da latência, em segundos, do treino e do teste do animal da caixa de esquila. Foi encontrado que a redução da atividade histaminérgica no hipocampo ventral, a partir da injeção intra de ranitidina foi capaz de reverter à tendência a extinção de memória aversiva propiciada pela histamina.

Palavras-chave: Neuroplasticidade Histamina, evocação da memória, esquila inibitória.

ABSTRACT

Neuroplasticity is the ability of the CNS to alter its structure based on experience, it is responsible for the learning mechanism. Studies suggest that drugs and neurotransmitters that participate in learning and memory are of fundamental importance for understanding the recovery process after CNS injury. This study aims to examine the actions of the hippocampal histaminergic system on the processes of acquisition and memory consolidation in an avoidance test. Wistar rats were surgically cannulated in ventral and dorsal hippocampus and trained in an avoidance test. The animals were individually placed on the platform and, when they put their four legs on the metal floor, a shock was released in the legs by 2s (0.4 mA, 40V). The procedure was repeated until the rat remain 50s on the platform. The latency was recorded immediately after training and the groups of animals received treatment with their respective drugs: histamine, saline (control), coinfusão histamine H1 receptor antagonists and antagonists (pyrilamine, 10.0 nmol / region) and H2 (ranitidine, 20,0 nmol / region) in the dorsal or ventral hippocampus. 24h later, the test were performed by the procedure repetition without any shock delivery. Memory retention was measured by the latency in seconds of training and testing the animal's box avoidance. It was found that the reduction of histaminergic activity in the ventral hippocampus, from intrahippocampal injection of ranitidine was able to reverse the trend toward extinction of aversive memory afforded by histamine.

Keywords: Neuroplasticity Histamine, evocation of memory, inhibitory avoidance.

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1 | Introdução | 9 |
| 2 | Objetivo | 11 |
| 2.1 | Objetivo geral | 11 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 11 |
| 3 | Materiais e Métodos | 11 |
| 3.1 | Animais | 11 |
| 3.2 | Grupos experimentais | 12 |
| 3.3 | Cirurgia Estereotáxica e Microinjeções | 13 |
| 3.4 | Administração das drogas | 14 |
| 3.5 | Procedimento experimental | 14 |
| 3.5.1 | Esquiva Inibitória | 14 |
| 3.5.2 | Labirinto em Cruz | 15 |
| 3.6 | Drogas | 15 |
| 3.7 | Verificação do posicionamento das cânulas. | 15 |
| 3.8 | Análise Estatística: | 16 |
| 4. | Resultados | 17 |
| 4.1 | Efeitos da Histamina no Hipocampo: | 17 |
| 4.2 | Envolvimento dos Receptores H1 e H2: | 17 |
| 4.3 | Efeitos sobre atividade locomotora e ansiedade: | 18 |
| 5. | Discussão | 19 |
| 6. | Conclusão | 22 |
| 7. | Referências Bibliográficas | 23 |

1 INTRODUÇÃO

A neuroplasticidade é a capacidade do Sistema Nervoso Central (SNC) de alterar a sua estrutura com base nas experiências. Essas modificações ocorrem como resposta a variados estímulos externos (p.ex. ambiente) e internos (p.ex.hormônios) sobre o SNC (KOLB E WHISHAW, 2002; UMPHRED & CARLSON, 2007). Foi a partir desse conceito que se tornou possível entender como os pacientes que sofreram lesões no SNC por traumas ou doenças conseguem readquirir funções perdidas após sofrerem lesões. (UMPHRED & CARLSON, 2007).

Estudos sugerem que os mesmos elementos que agem como agentes de facilitação da recuperação funcional estão presentes no processo de aprendizagem, sendo ambos processos baseados nos mesmos princípios fisiológicos (SÁ & MEDALHA, 2001). Com isso o estudo de drogas e neurotransmissores que participam dos processos de memória e aprendizagem são de fundamental importância para o entendimento do processo de recuperação após lesão de SNC, especialmente com o objetivo de correlacionar alterações plásticas funcionais de curto e médio prazo, as quais envolvem síntese e liberação de neurotransmissores.

Dentre os elementos químicos que participam desses processos, a histamina é um neurotransmissor muito estudado, diretamente envolvida na modulação de muitos processos fisiológicos e comportamentais. Nos mamíferos a histamina é sintetizada por um pequeno número de neurônios localizados no núcleo túbero-mamilar do hipotálamo, e é liberada por axônios que se ramificam profundamente em todas as regiões do encéfalo (rostralmente e caudalmente) (PANULA et al., 1984; 1989; 1990). A histamina possui quatro receptores - H1, H2, H3 e H4, sendo os subtipos H1, H2, H3 expressos no Sistema Nervoso Central, e o H4 detectado na periferia, particularmente na medula óssea e em leucócitos (NGUYEN et al., 2001). Receptores H1 e H2 excitam neurônios ou potencializam eventos excitatórios enquanto a ativação do receptor H3, por sua vez, causa auto-inibição dos neurônios histaminérgicos com a redução da síntese e da liberação de histamina (BROWN, 2001).

No que se refere ao envolvimento do sistema histaminérgico nos processos de reforço, aprendizagem e memória, muitos dados têm sido apresentados nos últimos anos, com resultados contraditórios. Existem evidências de que a histamina

facilita a aprendizagem e memória (DE ALMEIDA & IZQUIERDO, 1986; PRAST et al., 1996) bem como estudos que apontam para o efeito inibitório da histamina sobre os estes mesmos processos (MEDALHA, et al., 2000; COELHO et al., 2001)

É conhecida há muito tempo a função essencial do hipocampo na aprendizagem associativa (SQUIRE & KANDEL, 2003). O hipocampo é uma área cortical localizada no lobo temporal responsável pelo armazenamento temporário da memória de longa duração (IZQUIERDO, 2002) e pelo processo de aprendizagem associativa. (SQUIRE & KANDEL, 2003). A histamina encontrada no hipocampo participa da regulação de atividades fisiológicas dessa região, como por exemplo, na modulação do processo de potencial de longa duração, dependente do receptor NMDA, na região CA1 do hipocampo, sendo esta uma forma de plasticidade sináptica que muitos autores consideram um correlato celular da formação da memória (LYNCH, 2004; BROWN et al., 1995).

Diferentes sub-regiões hipocampais vêm sendo estudadas para um número variado de tarefas envolvendo medo/ansiedade, aprendizagem e memória (HOWLAND et al., 2008). Sabe-se que o hipocampo dorsal, além do córtex parietal, entorrinal e núcleo basolateral da amígdala (ROSSATO et al., 2004) está envolvido na tarefa de esquiva inibitória, na qual os animais aprendem a evitar a entrada em um ambiente no qual receberiam, por exemplo, um choque nas patas (LORENZINI et al., 1996; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; SQUIRE & KANDEL, 2003). A porção ventral do hipocampo, segundo alguns autores, tem relação com a memorização da ordem temporal dos eventos (HOWLAND & HARRISON, 2007) e em processos de ansiedade (ROSTAMI et al. 2006). Na sua relação com o sistema histaminérgico, Yu et al (2006) descreveram efeitos do aumento da liberação de histamina endógena no hipocampo ventral sobre a reversão do déficit induzido pela escopolamina em teste de esquiva, por meio da manipulação de receptores H_1 , H_2 e H_3 . Dados de outro estudo ainda sugerem que a histamina hipocampal ventral tem efeito por meio da coativação de receptores H_1 e H_2 em teste de esquiva, participando de todos os estágios da aprendizagem, a evocação, aquisição e consolidação (ROSTAMI, 2006; ALVAREZ & BANZAN, 2008). Recentemente, estudos de Xu e colaboradores (2009) indicaram ação diferente de drogas histaminérgicas no hipocampo dorsal e ventral, usando um teste de aprendizagem espacial.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as ações do sistema histaminérgico hipocampal sobre os processos de consolidação da memória, em um teste de esquiva inibitória em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da histamina no hipocampo dorsal e ventral sobre a memória de longa duração.
- Investigar o envolvimento dos receptores H_1 e H_2 histaminérgicos na mediação da consolidação da memória no hipocampo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos, pesando entre 240-290g no dia da cirurgia, foram utilizados. Foram mantidos em número de quatro por caixa, num ciclo de 12:12h claro/escuro, e umidade e temperatura controladas (23 ± 1 °C), com livre acesso comida e água. Uma semana antes do início dos experimentos cada animal foi manuseado diariamente por 3 minutos. Todos os experimentos foram realizados entre 9:00 e 12:00h da manhã.

A realização do presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética da UNIFESP, sob protocolo número 1606/09.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram conduzidos três blocos de experimentos. No primeiro bloco foi analisado o efeito da histamina no hipocampo dorsal e ventral sobre a memória de longa duração, por meio de injeções aplicadas imediatamente após o treino. Estes animais foram testados 24h depois.

- **Grupo 1.1** (n=10): *SAL_HV salina no hipocampo ventral, imediatamente após treino;*
- **Grupo 1.2** (n=10): *SAL_HD salina no hipocampo dorsal, imediatamente após treino*
- **Grupo 1.3** (n=10): *HIS_HV histamina no hipocampo ventral (10,0 nmol/região; imediatamente após o treino);*
- **Grupo 1.4** (n=10): *HIS_HD histamina no hipocampo dorsal (10,0 nmol/região; imediatamente após o treino).*

No segundo bloco foi investigado o envolvimento dos receptores H₁ e H₂ histaminérgicos na mediação da consolidação da memória no hipocampo através da co-infusão de drogas aplicadas imediatamente após o treino:

- **Grupo 2.1** (n=6): *HIS+PIR_HV histamina e pirilamina (10,0 nmol/região; imediatamente após o treino);*
- **Grupo 2.2** (n=6): *HIS+PIR_HD histamina e pirilamina (10,0 nmol/região; imediatamente após o treino);*
- **Grupo 2.3** (n=6): *HIS+RAN_HV histamina e ranitidina (20,0 nmol/região, imediatamente após o treino);*

- **Grupo 2.4** (n=6): *HIS+RAN_HD histamina e ranitidina (20,0 nmol/região, imediatamente após o treino);*

As drogas que obtiveram melhor resultado sobre a consolidação da memória foram testadas no labirinto em cruz elevado. Para isso, houve a infusão bilateral de ranitidina na dose de 20,0 nmol/região e salina no hipocampo ventral 24 horas antes do teste.

- **Grupo3.1** (n=6): *SAL_HV salina no hipocampo ventral 24 horas antes do teste*
- **Grupo 3.2** (n=6): *RAN_HV ranitidina no hipocampo ventral 24 horas antes do teste*

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E MICROINJEÇÕES

Os animais foram bilateralmente implantados com cânulas-guia, sob anestesia de Cetamina (90 mg/Kg; Dopalen®, Sespo Ind. Com. Ltda., Brasil) e Xilasina (10 mg/Kg; Dopaser®, Laboratorios Calier Ltda, Brasil) i.p. O procedimento cirúrgico consistiu inicialmente de tricotomia e imobilização da cabeça do animal em um equipamento estereotáxico, seguida da injeção de lidocaína/adrenalina subcutânea (2%, anestésico local), e exposição do crânio e perfuração da calvária. O posicionamento das cânulas-guia, de 13 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro será feito a 1,0 mm acima da região dorsal do hipocampo ou 3,0 mm acima da porção ventral do hipocampo. As seguintes coordenadas foram usadas, baseadas no atlas cerebral de Paxinos & Watson (1986): Hipocampo dorsal: anteroposterior (AP) = -3.6 mm; mediolateral (ML) = 2.8 mm; dorsoventral (DV) 2.0 mm; Hipocampo ventral: AP = -5.6 mm; ML = 5.0 mm; DV = 5.0 mm. As cânulas foram fixadas utilizando-se um pequeno parafuso de aço inoxidável e acrílico odontológico. Foi inserido um mandril (fio metálico) nas cânulas-guia, a fim de impedir sua obstrução até o momento do experimento. Após a cirurgia, um antibiótico intramuscular (Pentabiótico®, Fort Dodge Ltda, Brasil; 1.0 ml/kg) foi

administrado, e um intervalo de 5 a 7 dias de recuperação antes do experimento foi respeitado. Flumexim meglumine (Banamine®, Schering Ploug S.A., Brasil) na dose de 1,5 mg/kg, via intramuscular, foi utilizada como medicação antiinflamatória pós-cirúrgica.

3.4 ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

Para a microinjeção, os animais foram gentilmente imobilizados e a cânula de injeção foi introduzida através das cânulas-guia. A injeção foi feita por meio de uma bomba de infusão contínua, utilizando-se seringas Hamilton de 10 µl, conectadas a um tubo de polietileno (PE10, Clay Adams, USA) ligado à cânula de injeção. As drogas e a salina foram injetadas a um volume fixo de 0,5 µl por região, em um período de 120 segundos, a uma velocidade constante. A fim de evitar refluxo e favorecer a absorção da droga, um período de 60 segundos foi esperado antes da retirada do tubo das cânulas-guia.

3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 ESQUIVA INIBITÓRIA

A esquiva passiva é um equipamento confeccionado em alumínio de 2mm, composta por uma pequena plataforma paralela e meia polegada a acima de piso de barras de aço inoxidável com espaçamento de 12,5mm, por meio das quais, um eletrochoque é liberado nas patas do animal.

No dia do treinamento cada animal foi colocado na plataforma, e cada vez que ele descia e colocava as quatro patas nas barras de aço, um choque era liberado nas patas por 2s (0,4 mA; 40V). O procedimento era repetido até o animal permanecer 50s sob a plataforma. Foram registradas as tentativas (trials) e respectivas latências (em segundos). Os animais foram divididos em grupos conforme descrito no item 3.6. Após 24 horas foi feito o teste no qual a consolidação

da memória foi testada por meio do tempo que o animal demorava em descer (latência) da plataforma. No dia do teste, os animais não receberam choque elétrico.

3.5.2 LABIRINTO EM CRUZ

Para a certificação de que o efeito da administração das drogas não aconteceu por meio de alterações na atividade locomotora, comportamento exploratório ou ansiedade foi aplicado o Teste em Labirinto em Cruz Elevado. Os animais foram divididos em grupos e receberam a injeção das drogas nas doses propostas para os grupos no item 3.6, 24h antes dos testes. Para analisar o estado de ansiedade os animais serão testados no labirinto em cruz elevado, como descrito por Pellow e colaboradores (1985). O tempo gasto em cada braço aberto foi registrado por 5 minutos. Sendo que a análise da atividade locomotora foi através do número de entradas nos braços fechados. Os animais utilizados nestes experimentos não foram reutilizados.

3.6 DROGAS

As drogas utilizadas foram: Histamina (Sigma Chemical Co., U.S.A) na dose de 10,0 nmol/região; Pirilamina Maleato (Sigma Chemical Co., U.S.A), um antagonista H1, na dose de 10,0 nmol/região, e Ranitidina (Sigma Chemical Co., U.S.A), um antagonista H2 na dose de 20,0 nmol/região. Estas drogas foram dissolvidas em salina (0,9%) e administradas a temperatura ambiente. As drogas e suas doses foram determinadas com base na sua maior especificidade aos respectivos receptores e aos efeitos observados sobre aprendizagem, memória e reforço por trabalhos descritos na literatura (SILVA et al., 2006; XU et al., 2005; YU et al., 2006, ZARRINDAST et al., 2005; 2006^a; 2006^b).

3.7 VERIFICAÇÃO DO POSICIONAMENTO DAS CÂNULAS.

A verificação anatômica do posicionamento das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão foi realizada post mortem. Os animais foram profundamente anestesiados com uretana, e sacrificados por perfusão transcardíaca de salina a temperatura ambiente seguida de fluido de fixação (formoldeído 10%) por 6 minutos. Os cérebros foram mantidos na mesma solução de fixação por 24 horas e subsequente em uma solução de sacarose 20% e sob refrigeração para posterior corte em criostato, coloração e análise histológica. O Apenas os dados dos animais com implantes corretos foram incluídos na análise estatística dos dados.

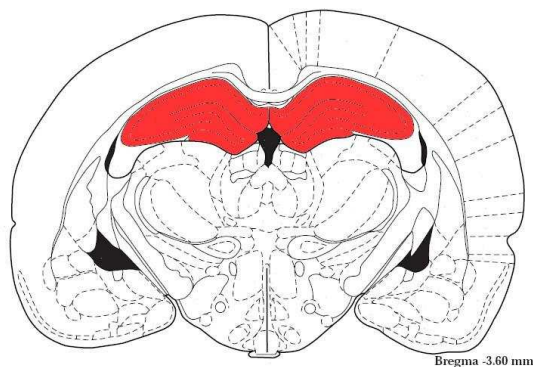


Figura 1: Extensão da infusão da droga na região correspondente ao hipocampo dorsal.

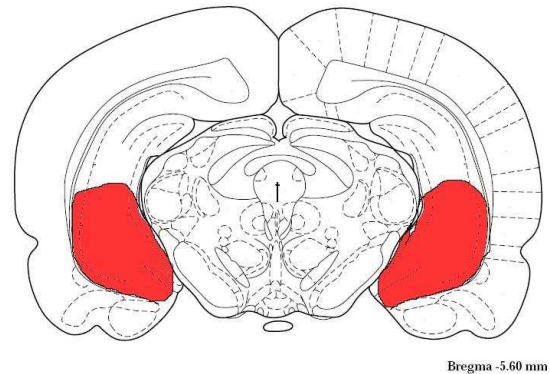


Figura 2: Extensão da infusão da droga na região correspondente ao hipocampo ventral.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados dos diferentes grupos no dia do teste foram analisados por meio da Análise de Variância de Uma via (ANOVA) ou pelo teste não-paramétrico de Kruskal Wallis, seguidos pelos Testes de Dunnett ou Tukey (igualdade de variância) ou Teste de Dunnett T3 (igualdade de variância não assumida) como análise post hoc. A comparação entre a latência de treino e de teste dentro do mesmo grupo foi analisada pelo teste t_Student (paramétrico) ou pelo Teste de Mann-Whitney (não paramétrico). O valor de $P \leq 0,05$ foi determinado como critério para a significância estatística.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA HISTAMINA NO HIPOCAMPO:

Para investigar a ação do sistema histaminérgico no hipocampo dorsal e ventral os animais receberam infusão de histamina nessas duas regiões. Nos dados obtidos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação aos efeitos da histamina quando administrada sozinha nessas duas regiões na comparação com o grupo controle. Contudo foi observada qualitativamente uma tendência à inibição da memória aversiva (*Figura 3*).

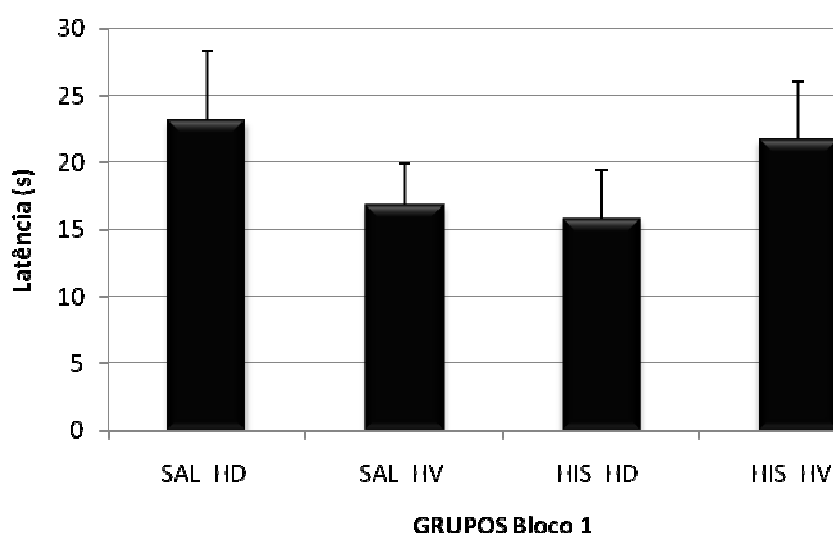


Figura 3. Média (+EPM) das latências de teste dos grupos controle *SAL_HD* (região dorsal tratado com salina), *SAL_HV* (região ventral tratado com salina) e grupos experimentais tratados: *HIS_HD* (região dorsal tratado com histamina na dose 10,0 nmol/região) e *HIS_HV* (região ventral tratado com histamina na dose 10,0 nmol/região). Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.2 ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES H1 E H2:

Foi realizada a co-infusão pós-treino de histamina e pirilamina e histamina e ranitidina nas regiões dorsal e ventral do hipocampo. A retenção da memória foi

verificada observando-se a latência, em segundos, dos valores do dia do teste em cada grupo.

Encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as latências de teste dos animais tratados com ranitidina no hipocampo ventral, comparado ao seu grupo controle (One Way ANOVA, Teste *post-hoc* de Tukey, $P=0,0018$) (Figura 4).

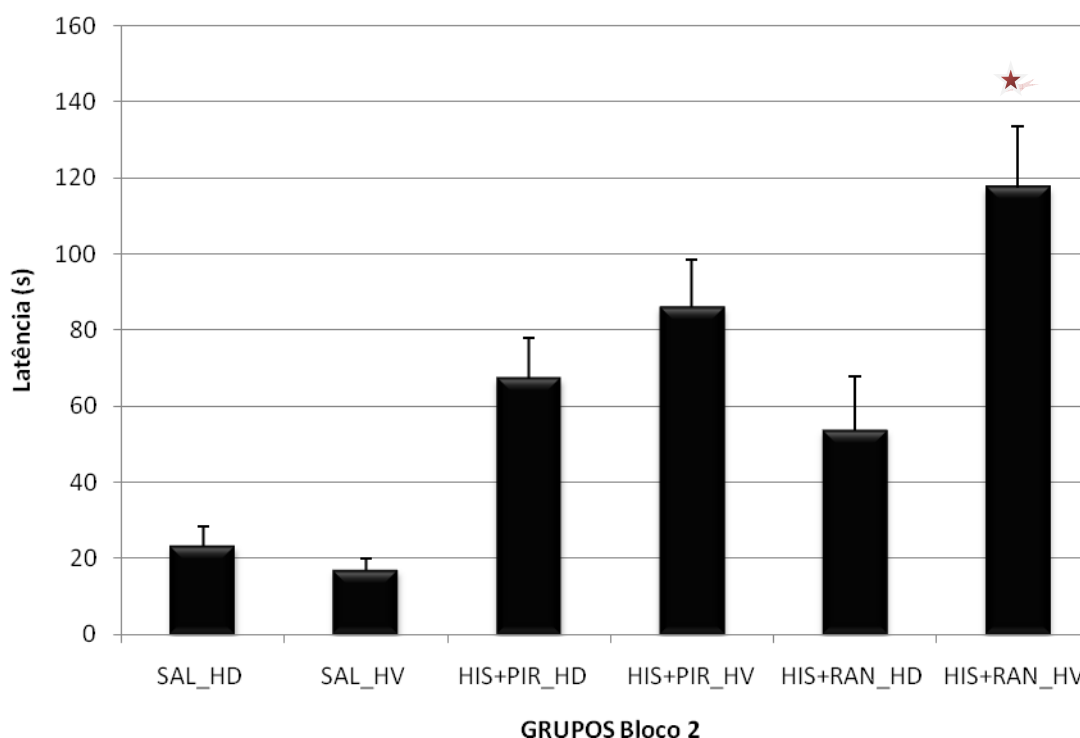


Figura 4. Média (+EPmM) das latências de teste dos grupos controle SAL_HD (região dorsal tratado com salina), SAL_HV (região ventral tratado com salina) e grupos experimentais tratados: HIS+PIR_HD (região dorsal tratado com histamina 10,0 nmol/região e pirilamina 10,0 nmol/região) e HIS+RAN_HD (região dorsal tratado com histamina 10,0 nmol/região e ranitidina 20,0 nmol/região). HIS+PIR_HV (região ventral tratado com histamina 10,0 nmol/região e pirilamina 10,0 nmol/região) e HIS+RAN_HV (região ventral tratado com histamina 10,0 nmol/região e ranitidina 20,0 nmol/região). * diferente de todos os grupos; $p=0,0018$.

4.3 EFEITOS SOBRE ATIVIDADE LOCOMOTORA E ANSIEDADE:

Nesse último bloco, testamos as drogas que obtiveram melhor resultado sobre a consolidação da memória no labirinto em cruz elevado. Para isso, houve a

infusão bilateral de histamina (10,0 nmol/região) e ranitidina (20,0 nmol/região) e salina no hipocampo ventral 24 horas antes do teste. O tempo A co-infusão de histamina e ranitidina apresentou uma tendência a um efeito ansiogênico em relação ao grupo controle, quando analisado o tempo despendido no braço fechado. Assim como não houve diferença entre os grupos em relação a quantidade de entradas nos braços fechado, indicando que não há alteração da atividade locomotora.

Tabela 1. Média (\pm EPM) da porcentagem de tempo nos braços abertos (%BA) e fechados (%BF) e Números de entrada no braço fechado (EBF) do labirinto em cruz elevado. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao tempo em cada braço ($p = 0.06$), assim como no número de entradas no braço fechado.

| Grupo | %BA | %BF | EBF |
|------------|---------------------|---------------------|-----|
| Controle | 40,845(\pm 8,8) | 59,155(\pm 8,7) | 7,4 |
| Ranitidina | 22,459 (\pm 7,9) | 77,541(\pm 12,2) | 4 |

5. DISCUSSÃO

A histamina é um neurotransmissor envolvido nos processos de reforço, aprendizagem e memória, porém, muitos dados têm sido apresentados com resultados contraditórios. Dere e colaboradores (2010) apontam que a razão dessa contradição de resultados ainda não está clara e que muitas variáveis como peso dos animais, tipos de experimentos, sensibilidade a dor, ansiedade e estresse podem contribuir para essa divergência.

Existem, provavelmente, várias maneiras pelas quais a histamina poderia regular os mecanismos envolvidos na aprendizagem e memória, e a modulação da atividade hipocampal é uma delas. (SILVA et al., 2006) No entanto, esta relação entre hipocampo e os efeitos da histamina é ainda pouco investigada. Nesse contexto, o presente estudo visou elucidar algumas questões que podem contribuir para um melhor entendimento dessa relação. Para isso, foi utilizada histamina a fim de observar seu efeito sobre o hipocampo dorsal e ventral e drogas como pirilamina

e ranitidina foram utilizadas a fim de mimetizar a redução da atividade histaminérgica.

Alguns estudos apontam que a infusão de histamina nas regiões dorsal e ventral do hipocampo prejudica a eficiência do aprendizado em um teste de esQUIVA inibitória ativa (ALVAREZ et al., 2001a, 2001b). Silveira (2007) descreveu que a histamina está relacionada à extinção de memória aversiva em ratos, quando infundida bilateralmente no hipocampo dorsal. Em relação ao hipocampo ventral, estudos indicaram que a histamina é capaz de interferir nos processos de memória, inibindo os três estágios de estágios de aprendizados da memória aversiva (evocação, aquisição e consolidação) (ALVAREZ et AL., 2001a; ALVAREZ & BANZAN, 2008). No presente estudo foi observado que a infusão bilateral deste neurotransmissor nas regiões dorsal e ventral do hipocampo imediatamente após o treino apresentou uma tendência a um efeito amnésico, sem diferença estatisticamente significativo.

O hipocampo dorsal parece estar envolvido com os processos de memória espacial (HOCK & BUNSEY 1998; DONG et al., 2009; TREIT, 2010) e o hipocampo ventral relacionado aos processos de memórias emocionais. (DONG et al., 2009; TREIT, 2010). Recentemente um estudo neuroanatômico sobre as subáreas hipocampais realizado por Dong e colaboradores (2009) mostrou que as regiões ventrais e dorsais do hipocampo são claramente diferentes, sugerindo a dissociação das funções destas regiões nos processos de memória.

Os receptores H1 localizados no SNC, apresentam-se em altas densidades em sistema límbico, incluindo hipotálamo, núcleo septal, amígdala medial e algumas áreas do hipocampo, enquanto que os receptores H2 estão mais presentes em gânglios basais e em algumas áreas do sistema límbico, como na formação hipocampal e amígdala (BROWN et al., 2001). Tanto H1 quanto H2 são responsáveis por funções excitatórias ou de potencialização de impulsos excitatórios (REINER & KAMODI, 1994). Com o objetivo de investigar qual receptor excitatório histaminérgico e qual região hipocampal estão mais envolvidos com o processo de aprendizado e memória, foi realizada a co-infusão de histamina com um antagonista do receptor H1 (pirilamina) e a co-infusão de histamina e ranitidina (antagonista do receptor H2) logo após o treino nas regiões dorsal. Os dados obtidos não apresentaram resultado estatisticamente significativo, sendo assim, não tiveram

efeito sobre a tendência amnésica causada pela histamina. Esses resultados se confirmam com a literatura atual, apontando que a pirilamina infundida na região CA1 do hipocampo dorsal não foi capaz de reverter os efeitos da histamina, porém divergem quanto ao envolvimento do receptor H2 (SILVEIRA, 2007).

Em relação à região ventral do hipocampo, Alvarez e Banzan (2008) sugerem que tanto o receptor H1 quanto o H2 estão envolvidos na modulação dos efeitos da histamina. Brown e colaboradores (2001) apontam que a histamina tem forte efeito excitatório no hipocampo, sendo que essa excitação está relacionada nas principais células (piramidais e granulares) com a ativação do receptor H2. Embora alguns trabalhos apontem que o bloqueio do receptor H1 é capaz de neutralizar a ação inibitória da histamina (ALVAREZ et al., 2001a, 2001b) no presente estudo a co-infusão de histamina e pirilamina nessa região não apresentou resultado significativo. No entanto, a co-infusão de histamina e ranitidina foi capaz de reverter a tendência a extinção de memória aversiva propiciada pela histamina. Esse resultado sugere que a facilitação da memória está relacionada a modulação do receptor H2 na região do hipocampo ventral.

Os testes de esquivas são consagrados na literatura e tem sido amplamente utilizados em pesquisas que visam estudar as bases neurofisiológicas da memória (NAHAS, 1999). A esquiva inibitória passiva (step-down) utilizada nesse estudo é uma das possibilidades de teste, pois pode ser aprendida em uma única sessão, não é um comportamento inato e tem neuroquímica e farmacologia bem descritas (CAREW, 1996).

Um aspecto importante referente ao paradigma da esquiva é que o animal pode desenvolver um “complexo de medo” resultante do choque recebido, o que pode alterar ou confundir os dados finais. (NAHAS, 1999). Para descartar essa possibilidade, a droga que apresentou resultados estatísticos no teste de esquiva, passou pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado. A co-infusão de histamina e ranitidina apresentou uma tendência a um efeito ansiogênico em relação ao grupo controle, em razão do tempo no braço fechado, sem apresentar resultado significativo. Mesmo resultado foi encontrado anteriormente por Zanrindast e colaboradores (2006_b, 2010) em relação aos efeitos da histamina e da ranitidina quando infundidas no hipocampo dorsal e ventral. Com base nesse resultado,

excluimos a ação ansiogênica ou ansiolítica da ranitidina sobre o resultado obtido na esquiva. Sendo sua ação específica no nosso trabalho sobre a memória.

Possivelmente esses diferentes efeitos da histamina ocorram em razão da heterogenia da distribuição das fibras neuronais no hipocampo e da estimulação dos receptores de diferentes maneiras. É necessário realizar mais estudos sobre o assunto, tendo em vista que a base do entendimento de diversas patologias se dá quando os processos fisiológicos estão bem esclarecidos. Estudos como este contribuem para a elucidação não só dos processos de aprendizagem e memória, mas também de outros envolvendo a neuroplasticidade, sendo de grande valia para o entendimento do fundamento de muitas técnicas fisioterapêuticas por facilitação neuromuscular proprioceptiva.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que a redução da atividade do receptor H₂ na região ventral do hipocampo tem ação facilitadora sobre os processos de aprendizagem e consolidação da memória em modelo de esquiva inibitória com ratos Wistar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, E.O. & BANZAN, A.M. Functional regional distribution of histamine receptors in the rat hippocampus: modulation of learning of an active avoidance response **J Neural Transm** v. 108 p. 1249–1261, 2001b
- ALVAREZ, E.O.; BANZAN, A.M. The activation of histamine-sensitive sites of the ventral hippocampus modulates the consolidation of a learned active avoidance response in rats. **Behavioural Brain Research**, v: 189. p.92–99, 2008.
- ALVAREZ, E.O.; RUARTE, M.B.; BANZAN, A.M. Histaminergic systems of the limbic complex on learning and motivation. **Behavioural Brain Research** v. 124 195–202, 2001a
- BROWN, R.E.; FEDOROV, N.B.; HAAS, H.L.; REYMANN, K.G. Histaminergic modulation of synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampal slices. **Neuropharmacology**, v. 34, p. 181-190, 1995.
- BROWN R.E.; STEVENS, D.R.; HAAS, H.L. The physiology of brain histamine. **Progress in Neurobiology**, v.63, p.637-672, 2001.
- CAREW, T.J. Molecular enhancement of memory formation. **Neuron** v. 16(1), p. 5-8, 1996.
- COELHO, J.L.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLI, R. Analysis of the effects of CPA and L-histidine on goldfish tested on a conditioned place preference model. **Behavioral Brain Research**, v. 124(2), p. 161-165, 2001.
- DE ALMEIDA, M.A.M.R.; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. **Archives of International Pharmacodynamic**, v. 283, p.193-198, 1986.
- DERE, E.; ZLOMUZICA, A.; SILVA, M.A.S.; ROUCCO, L.A.; SADILE, A.G.; HUSTON, J.P. Neuronal histamine and the interplay of memory, reinforcement and emotions. *Behavioural Brain Research* (2010).
- DONG, H.W.; SWANSON, L.W.; CHEN, L.; FANSELOW, M.S.; TOGA, A.W. Genomic–anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *PNAS*, v. 106 no. 28 p 11794-11799, 2009
- HOCK, B.J & BUNSEY, M. D. Differential Effects of Dorsal and Ventral Hippocampal Lesions. **The Journal of Neuroscience**, v. 18(17) p.7027–7032, 1998
- HOWLAND, J.G.; HARRISON, R. A. H.; PHILLIPS, A.G. Ventral hippocampal involvement in temporal order, but not recognition, memory for spatial information. **Hippocampus** v. 18(3). p.251 – 257, 2008.
- IZQUIERDO, I. *Memória*. Porto Alegre: ArtMed, 2002

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, p. 285-316, 1997.

KOLB, B.; WHISHAW, I. Q. Como aprendemos com a experiência. In: *Neurociência e comportamento*. Barueri: Manole, 2002. p. 490 – 525

LINCH, G.A. Long-term potentiation and memory. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 87-136, 2004.

LORENZINI, C.A.; BALDE, E.; BICHERELLI, C.; SACCHETTI, B.; TASSONI, G. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. **Brain Research**, v. 730, p. 32-39, 1996.

MEDALHA, C.C.; COELHO, J.L.; MATTIOLI, R. Analysis of the role of histamine in inhibitory avoidance in goldfish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 24: p. 295-305, 2000

NAHAS, T.R. Técnicas para o estudo do Sistema Nervoso. Editora Plêinade, 1999. P. 238

NGUYEN, T.; SHAPIRO, D.A.; GEORGE, S.R.; SETOLA, V.; LEE, D.K; CHENG, R.; RAUSER, L.; LEE, S.P.; LYNCH, K.R.; ROTH, B.L.; O'DOWD, B.F. Discovery of anovel member of the histamine receptor family. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 427-433, 2001.

PANULA, P.; YANG H.Y.; COSTA, E. Histamine-containing neurons in rat hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 2572-76, 1984.

PANULA, P.; AIRAKSINEN, M. S.; PIRVOLA, U.; KOTILAINEN, E. A histamine-containing neuronal system in human brain. **Neuroscience**, v. 34, p. 127-132, 1990.

PANULA, P.; PIRVOLA, U.; AUVINEM, S.; AIRAKSINEN, M.S. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. **Neuroscience**, v.28, p. 585-610, 1999.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety inthe rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149–167, 1985.

PRAST, H.; ARGYRIOU, A.; PHILIPPU, A. Histaminergic neurons facilitate social memory in rats. **Brain Research**, v. 734, p. 316-318, 1996.

REINER, P.B.; KAMONDI, A. Mechanisms of antihistamine induced sedation in the human brain: H1 receptor activation reduces a background leakage potassium current. **Neuroscience**, v. 59, p. 579-588, 1994.

ROSTAMI, P.; HAJIZADEH-MOGHADDAM, A.; ZARRINDAST, M-R. The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviours. **Physiology & Behavior**, v. 87, p. 891-896, 2006.

ROSSATO, J.I.; ZINN, C.G.; FURINI, C.; BEVILAQUA, L.R.M.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. A link between the hippocampal and the striation memory systems of the brain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78(3), p. 515-523, 2006.

SÁ, C.S.C & MEDALHA, C.C. **Aprendizagem e Memória – Contexto Motor**. **Rev. Neurociências**, v. 9(3): p. 103-110, 2001

SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.M.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, p. 100-106, 2006.

SILVEIRA, C.K.B. **Papel dos receptores histaminérgicos hipocâmpais na extinção de memórias aversivas**. 2007. 63p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. **Memória: da mente às moléculas**. 1ª. Edição. Tradução: Carla Dalmaz e Jorge A. Quillfeldt. Porto Alegre: Artmed, 2003.

TREIT, K. M.D Inactivation of the dorsal or ventral hippocampus with muscimol differentially affects fear and memory. *Brain Research* p. 145-151, 2010

UMPHRED, D.A; CARLSON, C. **Reabilitação Neurológica Plástica**. Tradução e revisão técnica Maria de Fátima palmiere Meirelles. RJ: Guanabara koogan, 2007

XU, L.S.; FAN YY, H.E.P.; ZHANG, W.P.; HU, W.W.; CHEN, Z. Ameliorative effects of histamine on spatial memory deficits induced by scopolamine infusion into bilateral dorsal or ventral hippocampus as evaluated by radial-arm maze **Task Clin Exp Pharmacol Physiol** 2009;.

XU, L.S.; YANG, L.X.; HU, W.W.; YU, X.; MA, L.; LIU, L.Y.; WEI, E.Q.; CHEN, Z. Histamine ameliorates spatial memory deficits induced by MK-801 infusion into ventral hippocampus as evaluated by radial maze task in rats. **Acta Pharmacol Sin**, v. 26(12), p. 1448-53, 2005.

YU, C.; SHEN, Y.; XU, L.; ZHU, Y.; ZHUGE, Z.; HUANG, Y.; HENK, T.; ROB, L.; WEI, E.; CHEN, Z. Effects of endogenous histamine in the ventral hippocampus on fear memory deficits induced by scopolamine as avaluated by step-though avoidance response in rats. **Physiology & Behavior**, v. 87, p. 687-693, 2006.

ZARRINDAST, M.R.; MOGHIMI, M.; ROSTAMI, P.; REZAVOF, A. Histaminergic receptors of medial septum and conditioned place preference: D1 dopamine receptor mechanism. *Brain Res*, v. 1109(1), p. 108-16, 2006a.

ZARRINDAST, M.R.; KHALILZADEH, A.; REZAYAT, S.M.; SAHEBGHARANI, M.; DJAHANGUIRI, B. Influence of intracerebroventricular administration of histaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Pharmacology*, v. 74(2), p. 106-12, 2005a.

ZARRINDAST, M.R.; FAZLI-TABAEI, S.; KHALILZADEH, A.; FARAHMANFAR, M.; YAHYAVI, S.H. Cross state-dependent retrieval between histamine and lithium. *Physiol Behav*, v. 86(1-2), p. 154-63, 2005b.

ZANRRIDAST, M.R.; TORABI, M.R., ROSTAMI, P.; FAZLI-TABEI.D. The effects of histaminergic agents in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.85(3):500-6, 2006b

ZANRRIDAST, M.R.; KHODARAHMI, P.; REZAYOF, A.; ORYAN, S. Withdrawal from repeated administration of morphine alters histamine-induced anxiogenic effects produced by intra-ventral hippocampal microinjection. **Journal of Psychopharmacology**, 24(6), p. 881-889, 2010